

DNA-Chiptechnologie – Prinzipien und Anwendungen

Scheper, Thomas
Stahl, Frank

Veröffentlicht in:
Jahrbuch 2003 der Braunschweigischen
Wissenschaftlichen Gesellschaft, S.56-61



J. Cramer Verlag, Braunschweig

THOMAS SCHEPER & FRANK STAHL, Hannover

DNA-Chiptechnologie – Prinzipien und Anwendungen

Hannover, 07.11.2003*

Am 26.06.2000 wurde auf einer Pressekonferenz vom HGP und Craig Venter (Celera) die vollständige Entschlüsselung des menschlichen Genoms gemeinsam bekanntgegeben. Durch das rasant fortgeschrittene Genom-Projekt – die komplette Sequenz des menschlichen Genoms ist fünf Jahre früher entschlüsselt als geplant – ist inzwischen ein Punkt erreicht, an dem die Zahl der bekannten Gensequenzen das Wissen über entsprechende funktionale Daten weit übersteigt. In einem gewissen Gegensatz zu dieser Vielzahl von DNA-Sequenzeinträgen in Datenbanken steht also die Tatsache, dass es keine entsprechenden Kenntnisse zur Funktion bzw. funktionalen Zusammengehörigkeit der betreffenden Gene gibt (Ermolaeva *et al.*, 1998). Man schätzt, dass von nur etwa 30% der humanen Gene die Funktion bekannt ist. Daher reichen konventionelle Methoden zur Analyse von Genexpression nicht mehr aus, die Anforderungen der beginnenden postgenomischen Ära zu erfüllen. Zur Analyse der Genexpression vieler Gene oder ganzer Genome in einem Experiment werden massiv parallele Ansätze notwendig. Dieser Herausforderung werden nur wenige Techniken gerecht. Als voraussichtlich beste Methode für den stattfindenden Übergang der Genforschung von *structural* zu *functional genomics* und die damit verbundene Analyse von Genexpression auf breitester Ebene bietet sich heute die Verwendung von sogenannten DNA-Chips an, mit denen man in der Lage ist, Genexpression quantitativ auf genomischer Ebene zu erfassen. Zellspezifische Antworten auf Genexpressionsebene können damit in einem bisher nicht gekannten Ausmaß analysiert werden und geben Einblicke in die molekulargenetischen Veränderungen innerhalb der Zelle. Diese Technologie, die als DNA Chiptechnologie oder DNA-(mikro)array bezeichnet wird, wird von großer Bedeutung für die zukünftige biologische Forschung sein, sie wird sich zu einer Schlüsseltechnologie des 21. Jahrhunderts entwickeln und vermutlich die moderne Biotechnologie ähnlich revolutionieren wie die Entdeckung der PCR Anfang der 80er Jahre.

Mikroarray-Systeme ermöglichen durch die systematische Anordnung von DNA-Sequenzen auf planaren Oberflächen und deren anschließender Exposition mit fluoreszenzmarkierter RNA Expressionsanalysen durchzuführen. Die DNA Chiptechnologie bietet die Möglichkeit eine sehr große Zahl von Hybridisierungen an immobilisierten Sonden gleichzeitig durchzuführen und auszuwerten. Dieser hohe Parallelisierungsgrad ermöglicht die simultane Analyse tausender Gene. Hierin besteht der große Vorteil gegenüber klassischen molekularbiologischen Methoden, mit deren Hilfe sich zum einen Veränderungen der Expressionsmuster einzelner Gene nachweisen lassen (mittels Northern Blot oder *in situ*-Hybridisierung) und zum andern neue Gene identifiziert werden können, die sich

* Kurzfassung eines Vortrags gehalten in der Klasse für Mathematik und Naturwissenschaften der Braunschweigischen Wissenschaftlichen Gesellschaft.

bestimmten Stimuli zuordnen lassen (mittels *Subtractive Hybridization* oder *Differential Display*). Gegenwärtig ermöglichen diese Techniken in der molekularbiologischen Forschung die Identifizierung und Expressionsanalyse einzelner Gene. Ein möglichst umfassendes und zugleich detailliertes Bild der Veränderungen im Genexpressionsmuster von z. B. sich differenzierenden Zellen erlauben diese Methoden aber nicht und das Wissen um die Funktion einzelner Gene reicht bei weitem nicht aus, um komplexe regulatorische Zusammenhänge, sogenannte „global views“ zu erkennen. Einer der wenigen Ansätze, der dieser Herausforderung gerecht wird, ist ein von Ed Southern entwickeltes Prinzip, bei dem einzelne markierte DNA-Stränge mit komplementären DNA-Strängen, die in Form von Gesamt-DNA auf einer soliden Matrix fixiert sind hybridisiert werden („Southern-Blot“).

Der Einsatz von Robotern, die Verwendung von Glasobjektträgern als Matrix sowie die sich rasant entwickelnde Bioinformatik ermöglichen nun das Aufbringen und die Analyse einer Vielzahl von Genen auf engstem Raum. Das Prinzip eines Chip-Experiments besteht darin, alle auf dem DNA-Chip befindlichen Genproben gleichzeitig mit einer Nukleinsäureprobe zu hybridisieren. Dazu wird in erster Linie fluoreszenzmarkierte cDNA eingesetzt, die durch reverse Transkription von RNA aus der zu untersuchenden Probe (z.B. Zellen oder Gewebe) gewonnen wird. Das parallele Hybridisieren einer Nukleinsäureprobe mit einer Vielzahl von komplementären Genproben auf einem DNA-Chip führt zu einem charakteristischen Hybridisierungsmuster mit entsprechender Hybridisierungsintensität (Schena *et al.*, 1998). Hier zeigt sich der entscheidende Vorteil dieser Technologie gegenüber anderen Methoden zur Untersuchung von Genexpression. Während sich herkömmliche Methoden auf die Untersuchung einzelner Gene beschränken, liefert ein DNA-Chipexperiment ein komplettes Genexpressionsprofil der zu untersuchenden Probe. Besonders interessant ist die hierdurch gegebene Möglichkeit, die Interaktion verschiedener Gene zu untersuchen.

DNA-Array: Struktur und Funktionsprinzip:

Zur Generierung der Mikroarrays werden PCR-generierte Einzelstrang-DNA-Fragmente, Oligodeoxynukleotide oder cDNAs mit Hilfe von speziellen Arrayern punktförmig auf vorherbestimmte Koordinaten einer beschichteten Glasplatte aufgebracht. Dazu werden je nach Untersuchungsziel bekannte Gene aus Zellen oder Gewebe zusammengestellt und eine spezifische Sequenz eines jeden Gens ausgewählt. Jedes einzelne der ausgewählten cDNA-Fragmente und Oligonukleotide ist dabei in seinem individuellen Rastersegment spezifisch für ein bestimmtes Gen. Der Array ist in eine Vielzahl von Rastersegmenten unterteilt, in denen cDNA-Fragmente oder Oligonukleotide als Replikas auf vorherbestimmte Koordinaten aufgetragen sind.

Aus Zellen/Gewebe wird DNA oder RNA isoliert und fluoreszenzmarkiert. Durch das Hybridisieren der markierten Probe mit komplementären Sequenzen der auf dem Array fixierten Oligonukleotide oder cDNA-Fragmente entsteht ein charakteristisches Muster. Nur wenn eindeutig von allen Auftragspunkten eines DNA-Fragmentes ein Signal ausgeht kann man unspezifische Hybridisierungen ausschließen. Das Hybridisierungsmuster und seine Intensität wird mit einem geeigneten Scanner erfaßt und mit einem Bildanalyseprogramm bearbeitet. Zur Orientierung bei der Auswertung des Arrays dienen sog.

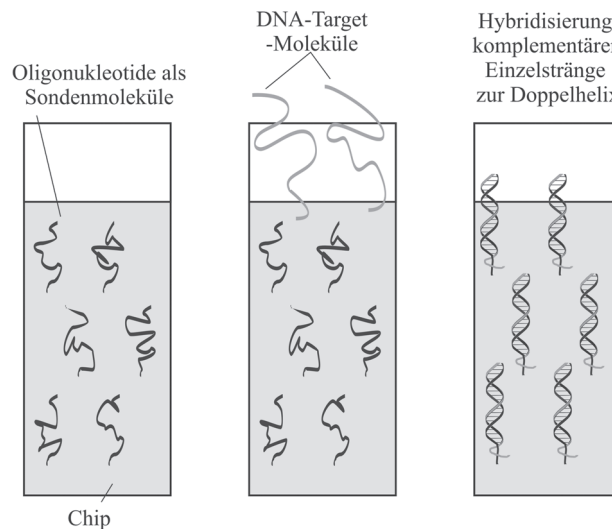


Abb. 1 Prinzip der DNA-Mikroarraytechnik

„Housekeeping-Gene“ und speziesunspezifische DNA. Bei der quantitativen Erfassung der Signale muß der über den Array variierende Grad des Hybridisierungshintergrunds berücksichtigt werden. Die Normalisierung der Array-Signale erfolgt über die erwähnten „Housekeeping-Gene“. Nach abgeschlossener Bildanalyse ist der eins-zu-eins Vergleich statistisch signifikanter Hybridisierungssignale und ihrer Stärke mit vorherig gespeicherten Array-Daten ähnlicher Experimente möglich und erlaubt so z.B. Einblick in den zeitlichen Verlauf des Genexpressionsprofils von Proben unter bestimmten Bedingungen. Das so erstellte Genexpressionsprofil gibt im Idealfall die Gesamtheit der regulierten Gene des Untersuchungsguts wieder. Das Prinzip eines Array-Experiments besteht darin, alle auf dem Array befindlichen Genproben simultan mit einer Nukleinsäureprobe zu hybridisieren. Dazu wird in erster Linie fluoreszenzmarkierte mRNA oder cDNA eingesetzt. Entscheidend ist hierbei, daß die durch reverse Transkription von RNA aus Zellen oder Gewebe gewonnene cDNA im Idealfall alle dort spezifisch exprimierten Gene umfaßt. Das parallele Hybridisieren einer Nukleinsäureprobe mit einer Vielzahl von komplementären Genproben auf einem DNA-Array führt zu einem charakteristischen Hybridisierungsmuster mit entsprechender Hybridisierungsintensität (Schena et al., 1998). Hier zeigt sich der entscheidende Vorteil dieser Technologie gegenüber anderen Methoden zur Untersuchung von Genexpression. Während sich herkömmliche Methoden auf die Untersuchung einzelner Gene beschränken, liefert ein DNA-Array ein komplettes Genexpressionsprofil der untersuchten Zelle bzw. des untersuchten Gewebes. Besonders interessant ist die hierdurch gegebene Möglichkeit, die Interaktion verschiedener Gene zu untersuchen. Das Erfassen von Unterschieden in der Genexpression ist durch das gleichzeitige Hybridisieren von normalen/pathogenen oder foetalen/adulten Zellen/Geweben möglich.

Herstellungsverfahren:

Voraussetzung für die DNA-Chip Technologie sind Verfahren zur Herstellung von DNA-Array Chips sowie die Analyse der Hybridisierungsmuster. Die Herstellung der Chips kann grundsätzlich auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen: (1) Synthese von Oligonukleotiden direkt auf dem Chip und (2) Kopplung von vorher hergestellten Oligonukleotiden oder DNA-Fragmenten an Chips. Das erste Verfahren ist bezüglich der erreichbaren Array-Dichte zu bevorzugen. Es basiert auf photolithographischen Techniken, bei denen die für die Oligonukleotidsynthese erforderlichen Schutzgruppen photolabil sind und durch gezielte Belichtung eines definierten Chipareals lokal entfernt werden. Dadurch wird eine gezielte Ankopplung eines weiteren Nukleotids ermöglicht. Die Anforderungen an die Image-Analyse, die im Rahmen der DNA-Chip Technologie gestellt werden, sind nicht grundsätzlich verschieden von denen in anderen Bereichen der fluoreszenten Bioanalytik.

Beispiel einer Mischhybridisierung:

Zum Nachweis einer genetischen Veränderung bei einem Patienten wird die Patienten-DNA mit einer grünen Fluoreszenzfarbe, eine Kontroll-DNA einer gesunden Person mit einer gelben Fluoreszenzfarbe markiert. An den Positionen, an denen die DNA-Sequenz des Patienten mit der der Kontrollperson übereinstimmt, werden beide DNAs bei der Hybridisierung an die gleichen DNA-Abschnitte auf dem Chip binden, es ergibt sich die Mischfarbe Blau. An der Position, an der die DNA-Sequenz des Patienten von der DNA-Sequenz der Kontrollperson abweicht, ergibt sich eine Farbdissoziation in gelb und grün. Deren genaue Position kann mit Hilfe einer hochauflösenden Laserkamera detektiert werden. Das Verfahren ermöglicht die gleichzeitige und schnelle Analyse einer Vielzahl von Genen.

Anwendungsmöglichkeiten:

Die DNA-Chip Technologie bietet die Möglichkeit eine sehr große Zahl von Hybridisierungen an immobilisierten Sonden gleichzeitig durchzuführen und auszuwerten. Dies eröffnet eine Reihe von Applikationen in der biomedizinischen Forschung und Diagnostik, die bisher nur mit aufwendigen Verfahren bis hin zur Sequenzierung größerer Genabschnitte angebar waren. Darüberhinaus können DNA-Array Chips eine Reihe von langwierigen und teuren diagnostischen Verfahren massiv vereinfachen und beschleunigen. Zu den zukünftigen Einsatzgebieten der DNA-Chip Technologie gehören u.a. die vollständige Mutationsanalyse von Genen in der (pränatalen) Diagnostik genetischer Erkrankungen, die HLA-Typisierung im Rahmen der Transplantationsmedizin, die Identifizierung von Mikroorganismen oder die Analyse komplexer Genexpressionsmuster. Diese kurze Auflistung zeigt bereits das weitreichende Potential und damit auch die zu erwartenden wirtschaftlichen Aspekte der Chip-Technologie für die molekularbiologische Diagnostik. Darüberhinaus ist davon auszugehen, daß aufgrund ähnlicher methodischer Ansätze eine parallele Entwicklung der Peptid-Array Technik möglich ist.

- a.) **Messung der Genaktivität (Prozeßoptimierung, Medizin)**
- b.) **Detektion von Veränderungen im Erbgut (Polymorphismen und Mutationen)**
- c.) **Medikamentenscreening (Medizin)**
- d.) **Detektion gentechnisch veränderter Organismen (Lebensmittel)**
- e.) **Organismen-/Virennachweis (Mikrobiologie)**
- f.) **Genetischer Stammbaum (Systematik)**
- g.) **Genetisches Fingerprinting (Sicherheitstechnik)**

Abb. 2: Mögliche Anwendungen der DNA-Chiptechnologie

1996 kam der erste DNA-Chip mit verschiedenen Varianten eines HIV-Gens zur Überprüfung von Resistenzen gegen bestimmte Medikamente auf den Markt. Seither wurde eine Vielzahl von Chips entwickelt und die Anzahl der auf einem Chip verankerten und testbaren DNA-Fragmente von einigen Tausend auf mehrere Hunderttausend erhöht. DNA-Chips mit allen nur denkbaren Varianten eines Gens werden zur Resistenzprüfung genutzt oder zur Feststellung von Mutationen, die zu Erbkrankheiten oder einem erhöhten Krebsrisiko führen können. Daneben gibt es Chips mit Hunderttausenden von Oligonucleotiden zur Sequenzierung und zum Nachweis von Polymorphismen. Andere Chips enthalten sämtliche bekannten Gene eines Organismus und werden zur Analyse der Genexpression genutzt, wofür sie mit fluoreszenzmarkierter mRNA (messenger-RNA) in Kontakt gebracht werden, die aus verschiedenen Zellen isoliert wurde, z.B. aus kranken und gesunden Zellen, Zellen vor und nach Induktion bestimmter Stoffwechseleigenschaften oder aus Zellen in verschiedenen Stadien des Zellzyklus oder Wachstums. Bei Organismen, deren Genom wie im Fall der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* inzwischen vollständig sequenziert wurde, ist die Expressionsanalyse sämtlicher Gene auf einmal möglich. Im Rahmen des humanen Genomprojekts (Human Genome Project) wurden bis Mitte 1998 die Sequenzen von etwa 6500 Genen entschlüsselt, die ebenfalls als DNA-Chip erhältlich sind und mit Fortschreiten des Projekts ständig erweitert werden. Der ebenfalls kommerziell erhältliche *E.coli*-Chip beinhaltet 500 einander überlappende Restriktionsfragmente des Darmbakteriums *E.coli* (*Escherichia coli*), die ringförmig wie das Genom aufgetragen sind. Auf jedem der 500 Fragmente befinden sich durchschnittlich 10 Gene.

Bringt man eine zu untersuchende fluoreszenzmarkierte DNA-Sequenz mit diesen Fragmenten in Kontakt, kann mit dem Hybridisierungssignal der Ort der Sequenz auf dem *E.coli*-Genom bestimmt werden.

Sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der klinischen Diagnostik werden DNA-Arrays bereits zum Mutations- und Polymorphismusscreening, zur Genotypisierung auf genomischer Ebene, zur chromosomalen Gen- und Mutationskartierung und zur Krankheitsdiagnose und -prognose eingesetzt. Diese Technologie wird darüber hinaus weitreichenden Einfluß auf die zukünftige Medikamentenentwicklung und Toxikologie haben. Auch ist die Möglichkeit zur substantiell erweiterten Einsicht in degenerative pathologische Prozesse bis hin zur genetischen Regulation des Alterungsprozesses gegeben.

Gegenwärtig werden die DNA-Arrays vor allem in der Krebsforschung benutzt. Die komplexen Veränderungen der Muster der Genexpression bei der Tumorgenese und

-progression können mit DNA-Arrays in bisher nicht realisierbarer Größenordnung erfaßt werden. Durch den Vergleich der Hybridisierungsmuster bzw. der unterschiedlichen Hybridisierungsintensität von mRNA aus gesundem gegenüber tumorösen Gewebe wird so in nur einem Experiment eine Aussage über die Rolle der sich verändernden Genexpression getroffen, deren Informationsmenge die Ergebnisse herkömmlicher Methoden zur Untersuchung von Genexpression um ein Vielfaches übersteigt. So wurde ein DNA-Chip mit 96.600 Oligonukleotiden einer Länge von jeweils 20 Nukleotiden für ein Mutationsscreening im Exon 11 des Brustkrebsgens BRCA1 eingesetzt. Von 15 Patientenproben mit bekannten Mutationen wurden 14 korrekt erkannt, in 20 Kontrollen traten keine falsch positiven Ergebnisse auf. Dazu konnten mit dem DNA-Chip acht verschiedene Polymorphismen erkannt werden, deren Sequenzen sich in nur einer Base unterscheiden. Im kommerziellen Bereich bietet die Firma Affymetrix (Santa Clara, California) einen DNA-Chip zur p53 Diagnostik an, mit dem die gesamte codierende Region (Exon 2-11) des menschlichen p53-Tumorsuppressorgens genotypisiert und simultan 18 bekannte Mutationen erkannt werden können. Der DNA-Chip auf Basis synthetischer Oligonukleotide ist so ausgelegt, dass Deletionen einzelner Basen identifiziert werden können. Weitere Anwendungsmöglichkeiten sind der sogenannte Nutrichip, mit dessen Hilfe pathogene Lebensmittelkeime aber auch gentechnisch veränderte Inhaltsstoffe in Nahrungsmitteln detektiert werden können.

Zusammenfassung und Ausblick:

Die DNA-Array Technologie ermöglicht Untersuchungen zur Genexpression und Mutationsdiagnostik in bis vor kurzem nicht vorstellbarem Umfang. Der Einsatz dieser Technologie führt allerdings auch zu einem Quantensprung im Informationsgehalt der einzelnen Experimente. Diese können jedoch nur dann in ihrem ganzem Umfang genutzt werden, wenn zeitgleich mit der Einführung der Array-Technologie die nötige Infrastruktur im Laborbereich bestehend aus Hard- und Software geschaffen wird. Dabei sind vor allem die z.T. hohen Kosten zu bedenken. Die DNA Chiptechnologie wird im Jahre 2005 ein geschätztes Marktvolumen von einer Milliarde USD übersteigen (Frost & Sullivan, 1999)

Literatur:

ERMOLAEVA *et al.*, (1998), Nat. Genet 20: 19-23

SCHENA *et al.*, (1998), Trends in Biotechnology 16, 301-306

FROST & SULLIVAN (1999), Report on DNA Microarrays

Prof. Dr.rer.nat. Thomas Scheper
Dr. Frank Stahl
Institut für Technische Chemie
Callinstr. 3
D-30167 Hannover